

РСТ

ВСЕМИРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ
Международное бюро

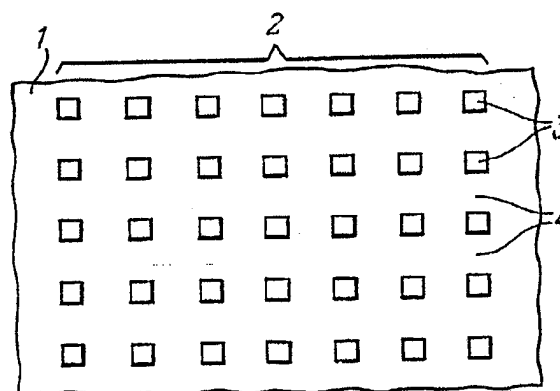
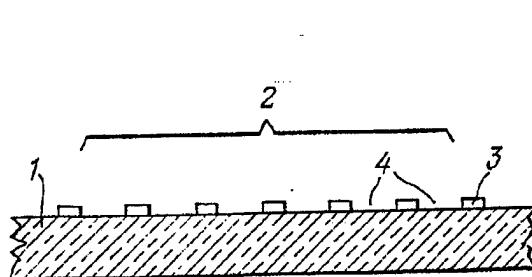


МЕЖДУНАРОДНАЯ ЗАЯВКА, ОПУБЛИКОВАННАЯ В СООТВЕТСТВИИ
С ДОГОВОРом О ПАТЕНТНОЙ КООПЕРАЦИИ (РСТ)

(51) Международная классификация изобретения Б: C12Q 1/68	A1	(11) Номер международной публикации: WO 92/16655 (43) Дата международной публикации: 1 октября 1992 (01.10.92)
<p>(21) Номер международной заявки: PCT/RU92/00052</p> <p>(22) Дата международной подачи: 18 марта 1992 (18.03.92)</p> <p>(30) Данные о приоритете: 4919321 18 марта 1991 (18.03.91) SU</p> <p>(71) Заявитель (для всех указанных государств, кроме US): ИНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ ИМЕНИ В.А.ЭНГЕЛЬГАРДА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК [RU/RU]; Москва 117984, ул. Вавилова, д. 32 (RU) [INSTITUT MOLEKULARNOI BIOLOGII IMENI V.A.ENGELGARDTA, Moscow (RU)].</p> <p>(72) Изобретатели; и</p> <p>(75) Изобретатели / Заявители (только для US): ХРАПКО Константин Радиевич [RU/RU]; Москва 121433, Рублевское шоссе, д. 89, корп. 3, кв. 66 (RU) [KHAPKO, Konstantin Radievich, Moscow (RU)]. ХОРЛИН Александр Анатольевич [RU/RU]; Москва 117342, ул. ген. Антонова, д. 7, корп. 1, кв. 131 (RU) [KHORLIN, Alexandr Anatolievich, Moscow (RU)]. ИВАНОВ Игорь Борисович [RU/RU]; Долгопрудный 141700, Московская обл., ул. Первомайская, д. 32/2, кв. 11 (RU) [IVANOV, Igor Borisovich, Dolgoprudny (RU)]. ЕРШОВ Геннадий Моисеевич [RU/RU]; Мос-</p>		<p>ква, Зеленоград, 1121, кв. 39 (RU) [ERSHOV, Genpady Moiseevich, Moscow (RU)]. ЛЫСОВ Юрий Петрович [RU/RU]; Москва 129344, ул. Енисейская, д. 10, кв. 292 (RU) [LYSOV, Yury Petrovich, Moscow (RU)]. ФЛОРЕНТЬЕВ Владимир Леонидович [RU/RU]; Москва 103473, Самойловский пер., д. 2, кв. 73 (RU) [FLORENTIEV, Vladimir Leonidovich, Moscow (RU)]. МИРЗАБЕКОВ Андрей Дарьевич [RU/RU]; Москва 333775, ул. Профсоюзная, д. 43, корп. 1, кв. 1 (RU) [MIRZABEKOV, Andrei Darievich, Moscow (RU)].</p> <p>(74) Агент: «СОЮЗПАТЕНТ»; Москва 103735, ул. Ильинка, д. 5/2 (RU) [-SOJUZPATENT-, Moscow (RU)].</p> <p>(81) Указанные государства: АТ (европейский патент), БЕ (европейский патент), СН (европейский патент), ДЕ (европейский патент), ДК (европейский патент), ЕС (европейский патент), FR (европейский патент), GB (европейский патент), GR (европейский патент), IE (европейский патент), IT (европейский патент), JP, LU (европейский патент), MC (европейский патент), NL (европейский патент), SE (европейский патент), US.</p> <p>Опубликована С отчетом о международном поиске.</p>

(54) Title: METHOD AND DEVICE FOR DETERMINING NUCLEOTIDE SEQUENCE OF DNA

(54) Название изобретения: СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ НУКЛЕОТИДНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ДНК И УСТРОЙСТВО ДЛЯ ЕГО ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ



(57) Abstract

A method for determining the nucleotide sequence of DNA includes forming of a pattern of oligonucleotides, its hybridization with the marked DNA to be tested, washing out under the conditions of dissociation of duplexes, identification of single substitutions of bases in the tested DNA by analysing the distribution of the mark and, depending on the results of the analysis, reconstruction of the nucleotide sequence of the tested DNA. The pattern of oligonucleotides is formed with their concentrations providing for the desired temperature of dissociation of duplexes in the course of washing. A device for determining the nucleotide sequence of DNA comprises a substrate (1) and a matrix (2) secured to the latter by means of a gel layer of a thickness not exceeding 30 mkm and containing a pattern of oligonucleotides of the desired length.

Способ определения нуклеотидной последовательности ДНК включает формирование набора олигонуклеотидов, проведение его гибридизации с меченной тестируемой ДНК, отмывку при условиях диссоциации дуплексов, распознавание одиночных замен оснований в тестируемой ДНК по анализу распределения метки и по результатам анализа реконструирование нуклеотидной последовательности тестируемой ДНК. При этом формируют набор олигонуклеотидов с концентрациями олигонуклеотидов, обеспечивающими заданную температуру диссоциации дуплексов в процессе отмывки.

Устройство для определения нуклеотидной последовательности ДНК содержит подложку 1 и прикрепленную к ней посредством прослойки геля с толщиной, не превышающей 30 мкм, матрицу 2, включающую набор олигонуклеотидов заданной длины.

ИСКЛЮЧИТЕЛЬНО ДЛЯ ЦЕЛЕЙ ИНФОРМАЦИИ

Коды, используемые для обозначения стран-членов РСТ на титульных листах брошюр, в которых публикуются международные заявки в соответствии с РСТ.

AT	Австрия	ES	Испания	MG	Мадагаскар
AU	Австралия	FI	Финляндия	ML	Мали
BB	Барбадос	FR	Франция	MN	Монголия
BE	Бельгия	GA	Габон	MR	Мавритания
BF	Буркина Фасо	GB	Великобритания	MW	Малави
BG	Болгария	GN	Гвинея	NL	Нидерланды
BJ	Бенин	GR	Греция	NO	Норвегия
BR	Бразилия	HU	Венгрия	PL	Польша
CA	Канада	IT	Италия	RO	Румыния
CF	Центральноафриканская Республика	IE	Ирландия	RU	Российская Федерация
CG	Конго	JP	Япония	SD	Судан
CH	Швейцария	KR	Корейская Народно-Демократическая Республика	SE	Швеция
CI	Кот д'Ивуар	LI	Лихтенштейн	SN	Сенегал
CM	Камерун	LK	Шри Ланка	SU	Советский Союз
CS	Чехословакия	LU	Люксембург	TD	Чад
DE	Германия	MC	Монако	TG	Того
DK	Дания			US	Соединённые Штаты Америки

СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ НУКЛЕОТИДНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ДНК
И УСТРОЙСТВО ДЛЯ ЕГО ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ
Область техники

5 Настоящее изобретение относится к области молекулярной биологии, а точнее к способу определения нуклеотидной последовательности ДНК и устройству для его осуществления.

10 Предшествующий уровень техники

В настоящее время описан ряд методов анализа нуклеотидной последовательности и распознавания
15 одиночных замен оснований при помощи гибридизации (Cotton R.G.H. // Biochem. J., 1989, V. 263, P. 1-10).

Распространенными являются методики, которые заключаются в том, что тестируемый фрагмент ДНК закрепляют на мембране и гибридизуют с мечеными
20 олигонуклеотидами (Wallace P.B., Shaffer J., Murphy R.F., Bonner J., Hirose T., Itakura K. // Nucleic Acid Res., 1979, V. 6, p. 3543-3557).

Известен способ и устройство для определения нуклеотидной последовательности ДНК (PCT/GB 89/00460, 1989), включающий синтез олигонуклеотидов на стеклянной
25 подложке-носителе, проведение гибридизации с радиоактивно- или флуоресцентно- меченной тестируемой ДНК, отмывку при условиях диссоциации дуплексов, распознавание наличия одиночных замен в исследуемой последовательности по анализу радиографического рисунка
30 или интенсивности флуоресценции в отдельных точках и реконструирование нуклеотидной последовательности ДНК по результатам анализа. Устройство для осуществления указанного способа содержит подложку и ковалентно прикрепленную к ее поверхности матрицу, состоящую из
35 всего или выбранного фрагмента набора олигонуклеотидов заданной длины, при этом указанные олигонуклеотиды могут участвовать в реакциях гибридизации. В качестве подложки, к поверхности которой прикрепляют олигонуклеотиды, используют стекло.

Однако, указанный способ и устройство характеризуются невысокой чувствительностью. Величина детектируемого сигнала от меченной ДНК, распределенной только в околоповерхностном слое подложки, с площади, занимаемой каждым отдельным элементом матрицы, имеет предел, обусловленный емкостью поверхности подложки (по ковалентно закрепленным олигонуклеотидам) и не может быть увеличена без увеличения или площади элемента матрицы или чувствительности метки. Указанные недостатки ограничивают возможность миниатюризации матрицы, разрешающую способность способа и устройства, повышают требования к чувствительности и разрешающей способности детектора и увеличивают расход реагентов. Способ громоздок, так как требует в случае анализа даже фрагмента тестируемой ДНК проведения ряда последовательных гибридизаций, последовательного досинтезирования используемой матрицы олигонуклеотидов с шагом в одну букву во всех точках, где гибридизация не дает однозначной информации о последовательности и, следовательно, каждый раз необходим выбор новых оптимальных условий гибридизации (температуры, концентраций реагентов и т.д.), что требует проведение дополнительных операций и значительных затрат времени и реагентов.

Раскрытие изобретения

В основу изобретения положена задача путем изменения условий проведения процесса и его конструктивного осуществления повысить чувствительность, точность и воспроизводимость способа и устройства, упростить распознавание точечных мутаций в нуклеотидной последовательности, повысить производительность, сократить длительность процесса, снизить затраты реагентов.

Задача решена тем, что в заявляемом способе определения нуклеотидной последовательности ДНК, включающем формирование набора олигонуклеотидов, проведение его гибридизации с меченной тестируемой ДНК,

отмывку при условиях диссоциации дуплексов, распознавание одиночных замен оснований в тестируемой ДНК по анализу распределения метки и по результатам анализа реконструирование нуклеотидной последовательности ДНК, согласно изобретению, формируют набор олигонуклеотидов с концентрациями олигонуклеотидов, обеспечивающими заданную температуру диссоциации дуплексов в процессе отмывки.

Для обеспечения надежного распознавания полностью комплементарных дуплексов от дуплексов с точечными мутациями (мисматчей) целесообразно отмывку проводить при фиксированном градиенте температуры.

С целью повышения точности анализа и сокращения его длительности предпочтительно в процессе отмывки определять зависимость количества оставшихся дуплексов от температуры и сравнивать с зависимостью для ДНК известной последовательности.

Целесообразно, с целью упрощения методики и сокращения ее длительности формировать набор олигонуклеотидов с концентрациями, обеспечивающими одинаковую температуру диссоциации для всех полностью комплементарных дуплексов.

Предпочтительно для сокращения длительности анализа формировать набор олигонуклеотидов с концентрациями, обеспечивающими проведение гибридизации и отмывки полностью комплементарных дуплексов при одинаковой температуре.

Заявленный способ дает возможность значительно упростить процесс по сравнению с известным способом, повысить его чувствительность, точность и воспроизводимость. Заявляемый способ позволяет повысить производительность вследствие снижения трудоемкости методики и сокращения ее длительности, а также снизить расход используемых реагентов. Кроме того, выбранные размеры ячеек и промежутков между ними являются наиболее подходящими для сочетания устройства, согласно изобретению, с известной технологической и измерительной аппаратурой.

Задача также решается тем, что заявляется

устройство для определения нуклеотидной последовательности ДНК, содержащее подложку, прикрепленную к ее поверхности матрицу, включающую набор олигонуклеотидов заданной длины, причем, согласно 5 изобретению, матрица прикреплена к подложке посредством прослойки геля с толщиной, не превышающей 30 мкм.

Предпочтительно прослойка геля состоит из множества по числу элементов матрицы участков, отделенных один от 10 другого промежутками. Прослойка геля обеспечивает объемное закрепление олигонуклеотидов при емкости значительно превосходящей емкость мономолекулярного слоя, а прослойка геля, состоящая из множества 15 участков, отделенных один от другого промежутками, дает возможность локализовать необходимое количество олигонуклеотидов в выбранном объеме геля. Все это 20 позволяет миниатюризировать матрицу, увеличить скорость всех протекающих процессов, тем самым сократить длительность методики по способу. Повысить чувствительность, разрешающую способность, точность, 25 воспроизводимость способа и устройства, а также сократить расход реагентов.

Предпочтительным вариантом заявляемого устройства является устройство, в котором поверхность каждого участка прослойки геля имеет форму квадрата с длиной 25 стороны 25-100 мкм и расстоянием между квадратами, равным удвоенной длине стороны. Такое конструктивное выполнение устройства позволяет быстро устанавливаться динамическому равновесию в процессе гибридизации, 30 снизить расход реагентов, повысить чувствительность и дает возможность использовать не радиоактивные, менее токсичные метки.

Для всех вариантов устройства является целесообразным выполнение прослойки из 35 полиакриламидного геля, которая удобна в применении, легко доступна и легко воспроизводима.

Заявляемое устройство позволяет упростить методику определения нуклеотидной последовательности ДНК, сократить ее длительность, повысить чувствительность, точность и воспроизводимость, а также снизить расход

реагентов.

Краткое описание чертежей

5 В последующем изобретение поясняется подробным описанием примеров его выполнения со ссылками на прилагаемые чертежи, на которых:

- Фиг.1 изображает устройство для определения нуклеотидной последовательности ДНК, вид сверху;
10 Фиг.2 - то же самое, что и на фиг.1, продольный разрез;
Фиг.3 - схему химических реакций при иммобилизации олигонуклеотида в полиакриламидный гель;
Фиг.4 - графически кривые отмывки АТ-богатых дуплексов (позиция а) и GC-богатых дуплексов (позиция в);
15 на оси ординат отложены оставшиеся дуплексы, в %, а на оси абсцис температура отмывки, °С;
Фиг.5 - график зависимости температуры отмывки дуплекса (показан вверху; М-матрица) от концентрации иммобилизованного олигонуклеотида, на котором
20 по оси ординат отмечены оставшиеся дуплексы, в %, а по оси абсцис температура отмывки, °С;
Фиг.6 - график зависимости температур отмывки АТ-богатых и GC-богатых дуплексов от
25 концентраций олигонуклеотидов, иммобилизованных в геле, на котором по оси ординат отмечены оставшиеся дуплексы, в %, а на оси абсцис температура отмывки, °С;
Фиг.7 - сравнительную диаграмму обнаружения мисматчей в дуплексах разного GC-состава на матрице с
30 подобранными концентрациями иммобилизованных олигонуклеотидов;
Фиг.8 - схему микроматрицы, иллюстрирующую специфичность гибридизации и чувствительность
35 метода.

Лучший вариант осуществления изобретения

Заявляемое устройство для определения нуклеотидной

последовательности ДНК содержит подложку 1 (фиг.1, 2), преимущественно стеклянную, и прикрепленную к ее поверхности матрицу 2 посредством прослойки геля толщиной, не превышающей 30 мкм. Прослойка геля может состоять из множества по числу элементов матрицы 2 участков 3, отделенных один от другого промежутками 4. Промежутки 4 могут быть различного размера. Участки 3 могут иметь различную форму.

Предпочтительным является устройство, в котором поверхность каждого участка 3 имеет форму квадрата с длиной стороны 25-100 мкм и промежутками 4 между квадратами, равными удвоенной длине стороны. Прослойка может быть выполнена из различного геля, предпочтительно из полиакриламидного геля.

Матрица может быть изготовлена следующим образом. Два предметных стекла, одно из которых предварительно обрабатывают Bind Silane, другое - Repel Silane и покрывают тонким слоем Triton X-100, устанавливают дистанционно с помощью прокладок толщиной, не превышающей 30 мкм, образованный зазор между ними заполняют раствором геля и дожидаются завершения процесса гелеобразования, затем верхнее стекло снимают. Стекло со слоем геля подсушивают, часть геля удаляют, например механическим способом, таким образом что на поверхности стекла остаются участки-ячейки геля с промежутками между ними. Полученную поверхность обрабатывают в течение 2-5 минут Repel Silane, промывают спиртом, затем бидистиллятом и высушивают. Олигонуклеотиды, содержащие на 3'-конце 3-метилуридин, окисляют 1 мМ периодатом натрия в течение 10 минут - 1 часа при комнатной температуре, осаждают 10-ю объемами 2%-ного LiClO_4 в ацетоне и растворяют в воде. Затем осуществляют иммобилизацию олигонуклеотидов в геле. Для этого из необходимого набора в ячейки высушенной на воздухе матрицы наносят одинаковые по объему микродозы окисленных олигонуклеотидов, причем в каждую ячейку строго одного типа.

При этом формируют набор олигонуклеотидов с концентрациями олигонуклеотидов, обеспечивающими

заданную температуру диссоциации дуплексов в процессе отмывки. Набор олигонуклеотидов можно формировать с концентрациями, обеспечивающими одинаковую температуру диссоциации для всех полностью комплементарных дуплексов или с концентрациями, обеспечивающими проведение последующих гибридизации и отмывки полностью комплементарных дуплексов при одинаковой температуре. Затем на матрицу со сформированным набором олигонуклеотидов наносят тестируемый фрагмент ДНК, меченный радиоактивной или флуоресцентной меткой, в буферном растворе. Нанесение проводят таким образом, чтобы раствор покрывал все точки с иммобилизованными олигонуклеотидами, проводят гибридизацию набора олигонуклеотидов с меченой тестируемой ДНК и осуществляют отмывку дуплексов при условиях диссоциации. После чего проводят распознавание одиночных замен оснований в тестируемой ДНК по анализу распределения метки.

По результатам анализа реконструируют последовательность тестируемой ДНК. В заявляемом способе с целью надежного различения полностью комплементарных дуплексов от дуплексов с точечными мутациями (мисматчами) отмывку дуплексов проводят при фиксированном градиенте температур. С целью сокращения длительности анализа и повышения его точности желательно в процессе отмывки определять зависимость количества оставшихся дуплексов от температуры и сравнивать с зависимостью для ДНК известной последовательности.

Установлено, что почти всегда существует такая температура, при которой отношение гибридизационных сигналов полностью комплементарного и соответствующего дуплекса с точечными мутациями достаточно велико (не менее 10 раз), чтобы надежно различать их. Исключение составляют некоторые краевые мисматчи, стабильность которых высока. Однако, это не ограничивает применимость заявляемого способа. Действительно, при исследовании известных последовательностей (например, выявление мутаций) всегда можно выбрать такой

иммобилизуемый олигонуклеотид, чтобы ожидаемая замена оснований оказалась внутри дуплекса. С другой стороны, при анализе неизвестной нуклеотидной последовательности (сиквенс ДНК) проблема краевых мисматчей относительно легко решается при обработке на ЭВМ результатов гибридизации фрагмента ДНК с олигонуклеотидной матрицей. Заявляемый способ обладает большой устойчивостью за счет избытка информации.

Для лучшего понимания настоящего изобретения приводятся следующие примеры осуществления заявленного способа.

Пример 1.

Изготовление матрицы с набором олигонуклеотидов.

Олигонуклеотиды синтезируют твердофазным фосфорамидитным методом (снятие защит проводят в насыщенном водном растворе аммиака при 55°C в течение 12 ч) и очищают электрофорезом в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях. Олигонуклеотиды метят ^{32}P ($[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ и полинуклеотидкиназой T4) по 5'-концу до специфической активности 3 мкКи/пмоль.

Два предметных стекла, одно из которых обработано Bind Silane, а другое - Repel Silane (LKB) и покрыто тонким слоем Triton X-100, устанавливают дистанционно с помощью прокладок толщиной 30 мкм. Образованный зазор между ними заполняют раствором 8%-ного акриламида, 30:1 N,N'-метиленбисакриламида, персульфата аммония и TEMED и оставляют для полимеризации на 1 ч. При этом между предметными стеклами формируется прослойка геля толщиной 30 мкм и с размерами которые определяются размерами предметного стекла. После полимеризации верхнее стекло снимают. Стекло со слоем полиакриламида обрабатывают в течение часа при комнатной температуре 50%-ным гидразином.

Олигодезоксинуклеотиды, содержащие на 3'-конце 3-метилилуридин, окисляют 1 мМ периодатом натрия в течение 1 ч при комнатной температуре, осаждают 10-ю объемами 2%-ного LiClO_4 в ацетоне и растворяют в воде. На высушенную на воздухе матрицу для иммобилизации с помощью микроманипулятора, снабженного дозатором с

капиллярной насадкой, наносят капли по 0,5 мкл окисленного олигонуклеотида (в концентрации 10 пмоль/мкл). Пластинки помещают на 4 ч во влажную камеру, сушат 0,5 ч на открытом воздухе, промывают 5 гибридационным буфером (1М NaCl, 10 мМ Na-фосфат pH 7,0, 1мМ этилендиаминтетрауксусная кислота), ополаскивают водой и хранят сухими при -20°C . Олигонуклеотиды иммобилизуют в ячейках квадратной матрицы.

- 10 В качестве линкера берут 3-метилуридин, присоединенный 5'-3' межнуклеотидной фосфодиэфирной связью к иммобилизуемому олигонуклеотиду. Выбор 3-метилуридина определяется тем, что он не образует прочных водородных связей ни с одним из природных 15 оснований. Схема химических реакций при иммобилизации олигонуклеотида в полиакриламидный гель проиллюстрирована на фиг.3.

- Окисление 3'-концевого рибонуклеозида олигонуклеотида 1 (фиг.3) NaIO_4 приводит к производному 20 2, несущему на 3'-конце диальдегидную группировку. С другой стороны, при обработке полиакриламида 3 гидразином часть амидных групп замещается на гидразидные 4, которые легко реагируют с 3'-диальдегидом. При этом образуется относительно 25 стабильное морфолиновое производное 5.

- Ход иммобилизации контролируют по $[5'-^{32}\text{P}]$ метке, введенной с помощью киназы в иммобилизуемые олигонуклеотиды. Выход иммобилизации (то есть доля олигонуклеотида, необратимо связавшегося с гелем) 80%. 30 При этом та же величина для неокисленного олигонуклеотида, использованного в качестве контроля на неспецифическую сорбцию, составляет менее 2%. Таким образом, доля молекул, связанных специфически за 3'-конец, превышает 98%.

- 35 Связь олигонуклеотида с полиакриламидом устойчива, и матрица выдерживает не менее 5-7 циклов гибридизации/отмывки без заметного изменения гибридизационных свойств. Время полураспада связи олигонуклеотид-гель при 60°C составляет 2 ч, а при 25°C

- 36 ч.

Емкость носителя оценивают путем иммобилизации одного и того же количества ^{32}P -меченного олигонуклеотида, разбавленного немеченным до различной специфической активности. 100 пмоль холодного олигонуклеотида на точку (то есть на 1 мм^2 поверхности или $0,03\text{ мм}^3$ объема геля) не насыщает связывания. Аналогичные эксперименты с окисленным периодатом $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$ показали, что емкость геля составляет около 1 нмоль на 1 мм^2 поверхности геля. Это соответствует концентрации 30 мМ активных групп (концентрация амидных групп в 8%-ном полиакриламиде составляет 1 М).

Пример 2.

Реконструирование нуклеотидной последовательности 17-членного дезоксиолигонуклеотида.

На подготовленной как описано в примере 1 олигонуклеотидной матрице проводят гибридизацию четырех гептадекануклеотидов сиквенсового праймера фага M13: $5'\text{-d(GTAAAACGACGCCAGT)}$ и трех его производных, отличающихся одним основанием (подчеркнуто):

$5'\text{-d(GTAAAACGATGGCCAGT)}$

$5'\text{-d(GTAAAACGAAGGCCAGT)}$

$5'\text{-d(GTAAAACGACGGCCAGT)}$

с иммобилизованными в геле олигонуклеотидами (длиной 7, 8, 9, 12 и 15 мономерных звеньев), полностью или частично комплементарными различным участкам гептадекамеров.

Меченный фрагмент ДНК ($0,01\text{ мкКи}$, 30 фмоль) в 1 мкл буфера гибридизации (1 М NaCl , $10\text{ мМ Na-фосфат pH } 7,0$, $1\text{ мМ этилендиаминтетрауксуная кислота}$) наносят на матрицу с иммобилизованными олигонуклеотидами таким образом, что каждая капля гибридизационной смеси в точности покрывает точку иммобилизованного олигонуклеотида, и инкубируют 1 ч при 0°C . Пластинку ополаскивают буфером гибридизации при 0°C , затем отмывают 10 раз по 1 мин 20 мл того же буфера при температуре, повышающейся на 5°C на каждой ступени отмывки. После каждой ступени гибридизационный сигнал регистрируют через свинцовый коллиматор в каждой точке

счетчиком радиоактивности (Minimonitor 125, Victoreen, США), снабженным сумматором импульсов.

Отношение остаточной радиоактивности к исходной в данной точке откладывают на графике в логарифмическом масштабе в зависимости от температуры (фиг.4).

На фиг.4 представлены кривые отмывки дуплексов, образованных праймером M13 или его аналогами с GC (фиг.4а) и AT-богатыми (фиг.4в) октануклеотидами, иммобилизованными в геле, комплементарными двум различным участкам праймера M13, но образующими дефектные дуплексы с его производными (все дуплексы представлены на фиг. 4).

В качестве меры стабильности дуплексов выбирают температуру отмывки (T_w), которую определяют как температуру, при которой гибридационный сигнал в соответствующей точке уменьшается в 10 раз по отношению к исходному уровню. Определяют зависимость кривых отмывки дуплекса от объемной концентрации иммобилизованного олигонуклеотида в геле. Как видно из фиг.5, T_w дуплекса сильно зависит от количества олигонуклеотида, иммобилизованного в пятне данного размера. Для исследованного интервала концентраций в пределах экспериментальной ошибки температура отмывки дуплекса повышается на определенное число градусов при увеличении концентрации иммобилизованного олигонуклеотида в определенное число раз. Данное правило выполняется для всех исследованных дуплексов. Таким образом, можно изменять стабильность каждого олигонуклеотида. В данном примере концентрация 5 пмоль на точку обеспечивает стабильность для дуплексов в диапазоне от 20 до 40°C.

Кроме олигонуклеотидов, показанных на фиг.4, исследовано значительное число 7-, 8-, 9-, 12- и 15-членников, полностью или частично комплементарных праймеру M13, а также дуплексов, содержащих другие типы мисматчей. Данные по отмывке дуплексов гептадекадезоксинуклеотидов с иммобилизованными октадезоксинуклеотидами приведены в таблице.

Как видно из фиг.4 и таблицы, почти всегда

Таблица

Тепловая диссоциация совершенных дуплексов и дуплексов, содержащих одиночные мисматчи*

Правильный дуплекс (T_d , °C)	Мисматч GT (ΔT_d^{**} , °C)	Мисматч GA (ΔT_d^{**} , °C)	Мисматч CC (ΔT_d^{**} , °C)
$\begin{matrix} \text{GTCGTTT} \\ 3' \text{---GCAGCAAAAT} \end{matrix} \begin{matrix} \text{M} \\ \text{M} \end{matrix}$ (28±0,5)	$\begin{matrix} \text{GTCGTTT} \\ 3' \text{---G}_{\text{T}}\text{AGCAAAAT} \end{matrix} \begin{matrix} \text{M} \\ \text{M} \end{matrix}$ (-7±1)	$\begin{matrix} \text{GTCGTTT} \\ 3' \text{---G}_{\text{A}}\text{AGCAAAAT} \end{matrix} \begin{matrix} \text{M} \\ \text{M} \end{matrix}$ (-16±2)	
$\begin{matrix} \text{CGTCGTT} \\ 3' \text{---GGCAGCAAAA} \end{matrix} \begin{matrix} \text{M} \\ \text{M} \end{matrix}$ (28±0,5)	$\begin{matrix} \text{C}^{\text{G}}\text{TCGTT} \\ 3' \text{---GG}_{\text{T}}\text{AGCAAAA} \end{matrix} \begin{matrix} \text{M} \\ \text{M} \end{matrix}$ (-13±2)	$\begin{matrix} \text{C}^{\text{G}}\text{TCGTT} \\ 3' \text{---GG}_{\text{A}}\text{AGCAAAA} \end{matrix} \begin{matrix} \text{M} \\ \text{M} \end{matrix}$ (-21±1)	$\begin{matrix} \text{C}^{\text{G}}\text{TCGTT} \\ 3' \text{---G}_{\text{C}}\text{CAGCAAAA} \end{matrix} \begin{matrix} \text{M} \\ \text{M} \end{matrix}$ (-3±0,5)
$\begin{matrix} \text{CCGTCGT} \\ 3' \text{---CGGCAGCAAA} \end{matrix} \begin{matrix} \text{M} \\ \text{M} \end{matrix}$ (33±0,5)	$\begin{matrix} \text{CC}^{\text{G}}\text{TCGT} \\ 3' \text{---CGG}_{\text{T}}\text{AGCAAA} \end{matrix} \begin{matrix} \text{M} \\ \text{M} \end{matrix}$ (-12±1)	$\begin{matrix} \text{CC}^{\text{G}}\text{TCGT} \\ 3' \text{---CGG}_{\text{A}}\text{AGCAAA} \end{matrix} \begin{matrix} \text{M} \\ \text{M} \end{matrix}$ (-24±1)	$\begin{matrix} \text{C}^{\text{C}}\text{GTCGT} \\ 3' \text{---CG}_{\text{C}}\text{CAGCAAA} \end{matrix} \begin{matrix} \text{M} \\ \text{M} \end{matrix}$ (-30±1)
$\begin{matrix} \text{GCCGTCGT} \\ 3' \text{---CCGGCAGCAA} \end{matrix} \begin{matrix} \text{M} \\ \text{M} \end{matrix}$ (41±0,5)	$\begin{matrix} \text{GCC}^{\text{G}}\text{TCGT} \\ 3' \text{---CCGG}_{\text{T}}\text{AGCAA} \end{matrix} \begin{matrix} \text{M} \\ \text{M} \end{matrix}$ (-11±1,5)	$\begin{matrix} \text{GCC}^{\text{G}}\text{TCGT} \\ 3' \text{---CCGG}_{\text{A}}\text{AGCAA} \end{matrix} \begin{matrix} \text{M} \\ \text{M} \end{matrix}$ (-25±1)	$\begin{matrix} \text{GC}^{\text{C}}\text{GTCGT} \\ 3' \text{---CCG}_{\text{C}}\text{CAGCAA} \end{matrix} \begin{matrix} \text{M} \\ \text{M} \end{matrix}$ (-36±2)
$\begin{matrix} \text{GGCCGTCG} \\ 3' \text{---ACCGGCAGCA} \end{matrix} \begin{matrix} \text{M} \\ \text{M} \end{matrix}$ (50±0,5)	$\begin{matrix} \text{GGCC}^{\text{G}}\text{TCG} \\ 3' \text{---ACCGG}_{\text{T}}\text{AGCA} \end{matrix} \begin{matrix} \text{M} \\ \text{M} \end{matrix}$ (-14±1,5)	$\begin{matrix} \text{GGCC}^{\text{G}}\text{TCG} \\ 3' \text{---ACCGG}_{\text{A}}\text{AGCA} \end{matrix} \begin{matrix} \text{M} \\ \text{M} \end{matrix}$ (-23±1)	$\begin{matrix} \text{GGC}^{\text{C}}\text{GTCG} \\ 3' \text{---ACCG}_{\text{C}}\text{CAGCA} \end{matrix} \begin{matrix} \text{M} \\ \text{M} \end{matrix}$ (-33±1)
$\begin{matrix} \text{TGGCCGTC} \\ 3' \text{---GACCGGCAGC} \end{matrix} \begin{matrix} \text{M} \\ \text{M} \end{matrix}$ (41±0,5)	$\begin{matrix} \text{TGGCC}^{\text{G}}\text{TC} \\ 3' \text{---GACCGG}_{\text{T}}\text{AGC} \end{matrix} \begin{matrix} \text{M} \\ \text{M} \end{matrix}$ (-12±0,5)	$\begin{matrix} \text{TGGCC}^{\text{G}}\text{TC} \\ 3' \text{---GACCGG}_{\text{A}}\text{AGC} \end{matrix} \begin{matrix} \text{M} \\ \text{M} \end{matrix}$ (-17±0,5)	$\begin{matrix} \text{TGGC}^{\text{C}}\text{GTC} \\ 3' \text{---GACCG}_{\text{C}}\text{CAGC} \end{matrix} \begin{matrix} \text{M} \\ \text{M} \end{matrix}$ (-37±3)
$\begin{matrix} \text{CTGGCCGT} \\ 3' \text{---TGACCGGCAG} \end{matrix} \begin{matrix} \text{M} \\ \text{M} \end{matrix}$ (36±0,5)	$\begin{matrix} \text{CTGGCC}^{\text{G}}\text{T} \\ 3' \text{---TGACCGG}_{\text{T}}\text{AG} \end{matrix} \begin{matrix} \text{M} \\ \text{M} \end{matrix}$ (-10±1,5)	$\begin{matrix} \text{CTGGCC}^{\text{G}}\text{T} \\ 3' \text{---TGACCGG}_{\text{A}}\text{AG} \end{matrix} \begin{matrix} \text{M} \\ \text{M} \end{matrix}$ (-6±1)	$\begin{matrix} \text{CTGGC}^{\text{C}}\text{GT} \\ 3' \text{---TGACCG}_{\text{C}}\text{CAG} \end{matrix} \begin{matrix} \text{M} \\ \text{M} \end{matrix}$ (-35±0,5)
$\begin{matrix} \text{ACTGGCCG} \\ 3' \text{---TGACCGGCA} \end{matrix} \begin{matrix} \text{M} \\ \text{M} \end{matrix}$ (39±1)	$\begin{matrix} \text{ACTGGCC}^{\text{G}} \\ 3' \text{---TGACCGG}_{\text{T}}\text{A} \end{matrix} \begin{matrix} \text{M} \\ \text{M} \end{matrix}$ (-5±1)	$\begin{matrix} \text{ACTGGCC}^{\text{G}} \\ 3' \text{---TGACCGG}_{\text{A}}\text{A} \end{matrix} \begin{matrix} \text{M} \\ \text{M} \end{matrix}$ (-2±0,5)	$\begin{matrix} \text{ACTGGC}^{\text{C}}\text{G} \\ 3' \text{---TGACCG}_{\text{C}}\text{CA} \end{matrix} \begin{matrix} \text{M} \\ \text{M} \end{matrix}$ (-30±0,5)

*Данные усреднены по трем измерениям.

**Понижение температуры отмывки дефектного дуплекса по сравнению с совершенным.

Примечание: Мисматчи выделены жирным шрифтом, M - матрица, символ "d" для удобства опущен.

существует такая температура, при которой отношение гибридационных сигналов полностью комплементарного и соответствующего дефектного дуплекса достаточно велико (не менее 10 раз), чтобы надежно различить их.

- 5 Искключение составляют некоторые краевые мисматчи, стабильность которых аномально высока.

- В случае гибридизации с октануклеотидами получают 7-кратный избыток информации, причем любой нуклеотид фрагмента ДНК в шести случаях из восьми образует
10 внутреннюю пару с иммобилизованным олигонуклеотидом и лишь в двух случаях краевую. Проводят сравнение кривых отмывки для различения полностью комплементарных дуплексов от дуплексов с точечными мутациями и таким образом обнаруживают одиночные замены оснований в ДНК.
15 По перекрытию полностью комплементарных дуплексов реконструируют исходный гептадекамер.

Пример 3

- Определение зависимости температуры отмывки дуплексов от концентрации иммобилизованного
20 олигонуклеотида осуществляют следующим образом.

- Процесс проводят аналогично примеру 1. Зависимость температуры отмывки дуплексов T_w от концентрации иммобилизованного олигонуклеотида проводят в пятне объемом $0,03 \text{ мм}^3$ в интервале концентраций 5,0; 1,5;
25 0,5; 0,15 пмоль олигонуклеотида.

- Зависимость кривых отмывки дуплекса от объемной концентрации иммобилизованного олигонуклеотида в геле представлена на фиг.5 (в пятне объемом $0,03 \text{ мм}^3$ концентрация олигонуклеотида 5,0 (I), 1,5 (II), 0,5
30 (III), 0,15 (IV) пмоль). Как видно из графика на фиг.5, T_w дуплекса сильно зависит от количества олигонуклеотида, иммобилизованного в пятне данного размера. Для исследованного интервала концентраций в пределах экспериментальной ошибки температура отмывки
35 дуплекса повышается на определенное число градусов при увеличении концентрации иммобилизованного олигонуклеотида в определенное число раз. Данное правило выполняется для всех исследованных дуплексов (на фиг.5 приведен один из примеров).

Пример 4

Возможность выравнивания стабильности полностью комплементарных дуплексов осуществляют следующим образом.

- 5 Процесс проводят аналогично примеру 2, но варьируется концентрация для различных иммобилизованных олигонуклеотидов:

АТ 90 пмоль, GC 0,3 пмоль.

- Зависимость стабильности (температуры диссоциации) дуплексов позволяет обнаруживать мисматчи в дуплексах разного GC-состава "на одной пластинке". Как видно на фиг. 4, показанные там два иммобилизованных олигонуклеотида настолько различаются по GC-составу, что полностью комплементарный дуплекс АТ-богатого олигонуклеотида (фиг. 4а, кривая 1) менее устойчив, чем дуплекс GC-богатого, содержащий мисматчи (фиг. 4в, кривые 2 и 3). Очевидно, что в такой ситуации гибридизация фрагмента ДНК с матрицей, на которой оба олигонуклеотида, при любой фиксированной температуре не позволяет узнать с точностью до одного основания, имеются ли в данном фрагменте комплементарные им последовательности или нет.

- Обнаруженная нами зависимость T_w от концентрации иммобилизованного олигонуклеотида позволяет решить проблему уравнивания температур диссоциации дуплексов различного GC-состава. Как показано на фиг. 6, кривые отмывки АТ- и GC-богатого дуплексов ($\Delta T_w = 30^\circ\text{C}$ при равных концентрациях) могут быть полностью совмещены путем подбора концентраций иммобилизованных олигонуклеотидов в соответствующих точках.

- Можно совместить кривые отмывки для любого набора олигонуклеотидов и таким образом получить "приведенную" матрицу олигонуклеотидов. Температуры отмывки полностью комплементарных (совершенных) дуплексов для всех точек такой матрицы близки между собой, что позволяет с помощью всего одной отмывки при оптимальной температуре однозначно определить те точки матрицы, с которыми анализируемый фрагмент ДНК образует совершенные дуплексы.

Пример 5.

Гибридизацию и отмывку при одинаковой температуре на "приведенной" матрице с подобранными концентрациями иммобилизованных олигонуклеотидов осуществляют следующим образом.

Процесс проводят аналогично примеру 4.

"Приведенную" матрицу олигонуклеотидов, по три точки каждого из двух, гибридизуют и отмывают при температуре 35°C. Указанный принцип проиллюстрирован на сравнительной диаграмме (фиг.7). Соотношение остаточных сигналов однозначно показывает, в каких точках дуплексы были полностью комплементарными, несмотря на то, что один из мисматчей - краевой GT, весьма устойчив.

Пример 6.

Иллюстрация чувствительности, точности и воспроизводимости предлагаемого способа и устройства.

Подготавливают олигонуклеотидную матрицу аналогично описанному в примере 1, но при этом перед обработкой 50%-ным гидразином пластину с прослойкой геля высушивают на воздухе и часть его удаляют, например механическим способом, оставляя участки в виде квадратов со стороной равной 25-100 мкм и соответственно промежутками 50-200 мкм.

Для гибридизации используют фрагменты с флуоресцентной меткой тетраметилродамином на 3'-конце, вводимой с помощью терминальной полинуклеотидтрансферазы (сравнение соответствующих кривых отмывки показало, что тетраметилродамин не влияет на устойчивость дуплекса).

Использование флуоресцентной метки позволяет проводить гибридизацию в микромасштабе. На фиг.8 представлена схема одной из микроматриц, на которой октануклеотид 5'-d(GGCCGTGG) иммобилизован в квадратах геля со стороной 100 мкм и промежутками равными 200 мкм. Как видно на фиг.8, позиция а, гибридизация с такой микроматрицей позволяет весьма надежно детектировать замены отдельных оснований в последовательности (на фиг.8), в квадратики 1 (правильный дуплекс), в квадратах 2, 3, и 4 (дуплексы с мисматчами GA, GT и CC, соответственно).

Аналогичные эксперименты были проведены на микроматрицах, где квадратики геля имели сторону, равную 25 мкм; 30 мкм; 50 мкм и 75 мкм и промежутки между ними были соответственно равны 50 мкм; 60 мкм; 5 100 мкм и 140 мкм.

Поскольку распределение флуоресцентной метки может быть измерено с очень высокой чувствительностью и пространственным разрешением, например, при помощи микроскопа, то предел обнаружения гибридизационного сигнала определяется только отношением сигнал/фон и не зависит от размеров объекта, интенсивность флуоресценции которого измеряется. Следовательно, чувствительность обратно пропорциональна площади объекта, то есть ячейки олигонуклеотидной матрицы.

15 Миниатюризация матрицы позволяет повысить чувствительность способа. Так, квадратики, изображенные на фиг. 8, позиция d, содержат соответственно 1 фмоль, 100 амоль и 10 амоль тетраметилродаминового производного дезоксиуридина. При этом отношение

20 сигнал/фон для квадратики d 3 равно 2, что достаточно для надежного определения количества вещества.

Промышленная применимость

25 Заявляемые способ и устройство могут найти применение в медицине, молекулярной биологии, сельском хозяйстве для генетической диагностики, секвенирования и картирования ДНК, детектирования мутаций.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

п.1 Способ определения нуклеотидной последовательности ДНК, включающий формирование набора олигонуклеотидов, проведение его гибридизации с меченной тестируемой ДНК, отмывку при условиях диссоциации дуплексов, распознавание одиночных замен оснований в тестируемой ДНК по анализу распределения метки и по результатам анализа реконструирование нуклеотидной последовательности тестируемой ДНК, характеризующийся тем, что формируют набор олигонуклеотидов с концентрациями олигонуклеотидов, обеспечивающими заданную температуру диссоциации дуплексов в процессе отмывки.

15 п.2 Способ по п.1, характеризующийся тем, что отмывку проводят при фиксированном градиенте температуры.

п.3 Способ по любому из пп.1,2 характеризующийся тем, что в процессе отмывки определяют зависимость количества оставшихся дуплексов от температуры и сравнивают с зависимостью для ДНК известной последовательности.

п.4 Способ по п.1, характеризующийся тем, что формируют набор олигонуклеотидов с концентрациями, обеспечивающими одинаковую температуру диссоциации для всех полностью комплементарных дуплексов.

п.5 Способ по п.1, характеризующийся тем, что формируют набор олигонуклеотидов с концентрациями обеспечивающими проведение гибридизации и отмывки полностью комплементарных дуплексов при одинаковой температуре.

п.6 Устройство для определения нуклеотидной последовательности ДНК, содержащее подложку (1) и прикрепленную к ее поверхности матрицу (2), включающую набор олигонуклеотидов заданной длины, характеризующееся тем, что матрица (2) прикреплена к подложке (1) посредством прослойки геля толщиной, не превышающей 30 мкм.

п.7 Устройство по п.6, характеризующееся тем, что прослойка геля состоит из множества по числу элементов

матрицы (2) участков (3), отделенных один от другого промежутками (4).

п.8 Устройство по п.7, характеризующееся тем, что поверхность каждого участка имеет форму квадрата с 5 длиной стороны 25-100 мкм и расстоянием между квадратами, равным удвоенной длине стороны.

п.9 Устройство по любому из пп.6-8, характеризующееся тем, что прослойка выполнена из полиакриламидного геля.

1/7

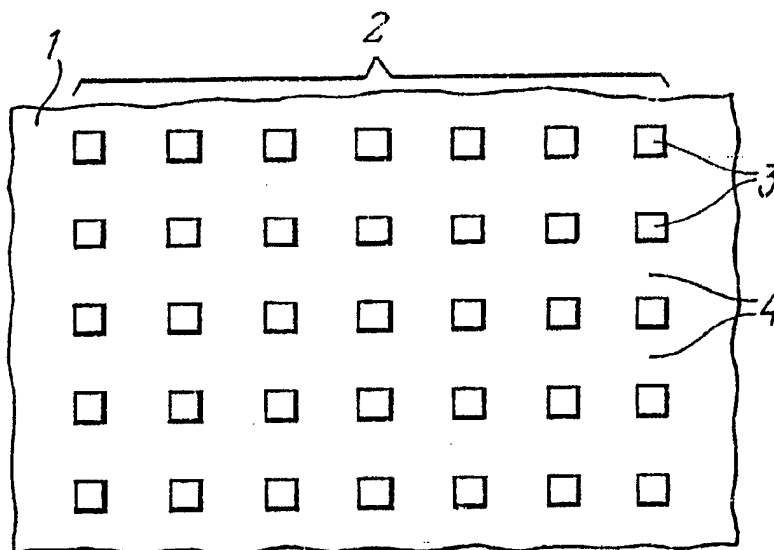


FIG. 1

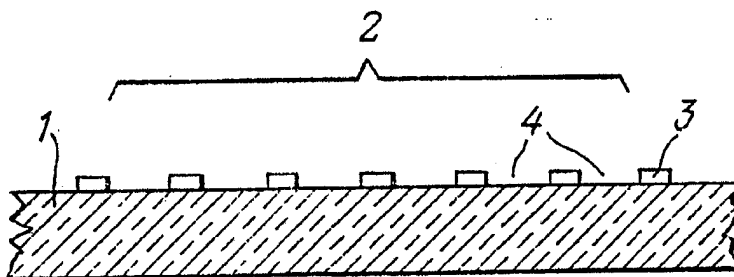


FIG. 2

2/7

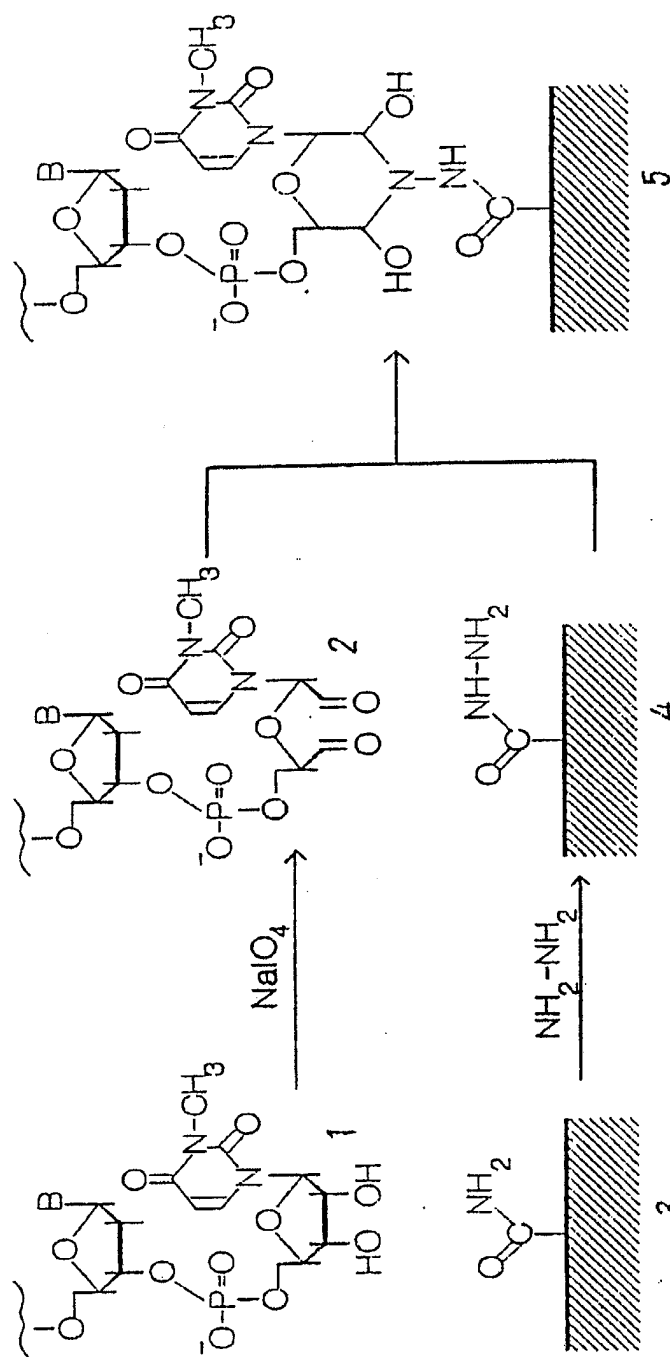


FIG. 3

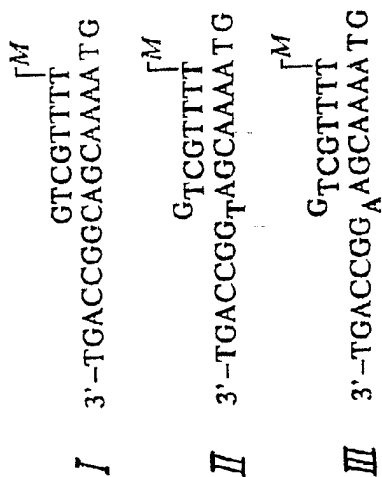


FIG. 4a

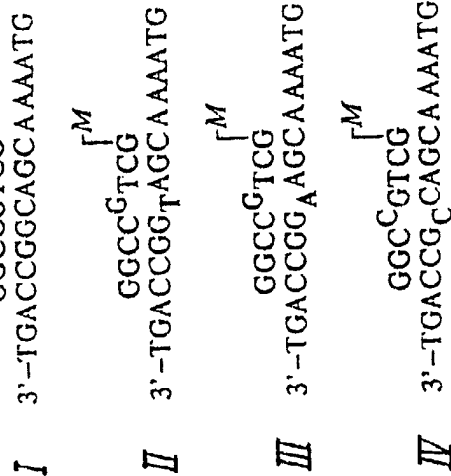
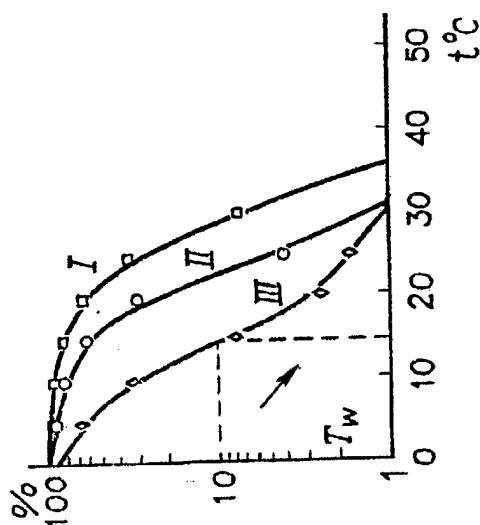
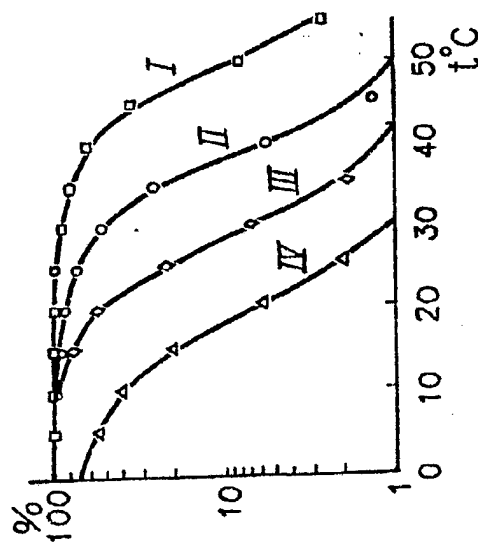


FIG. 4b



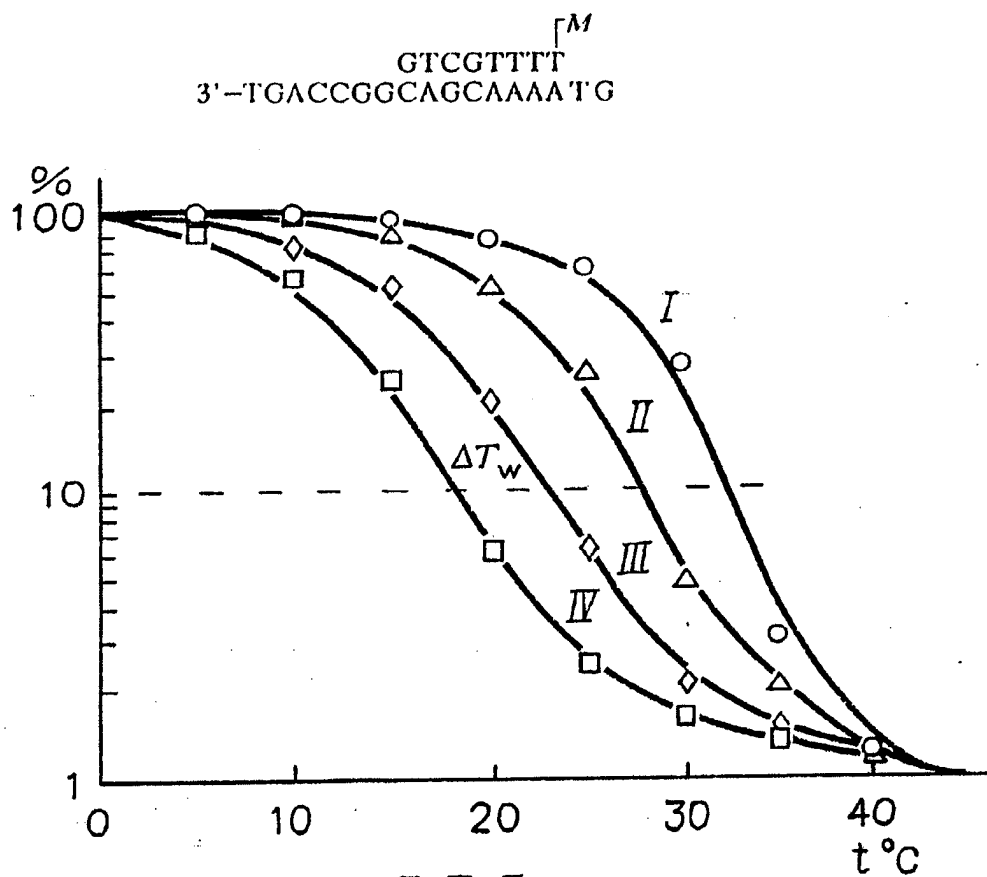


FIG. 5

5/7

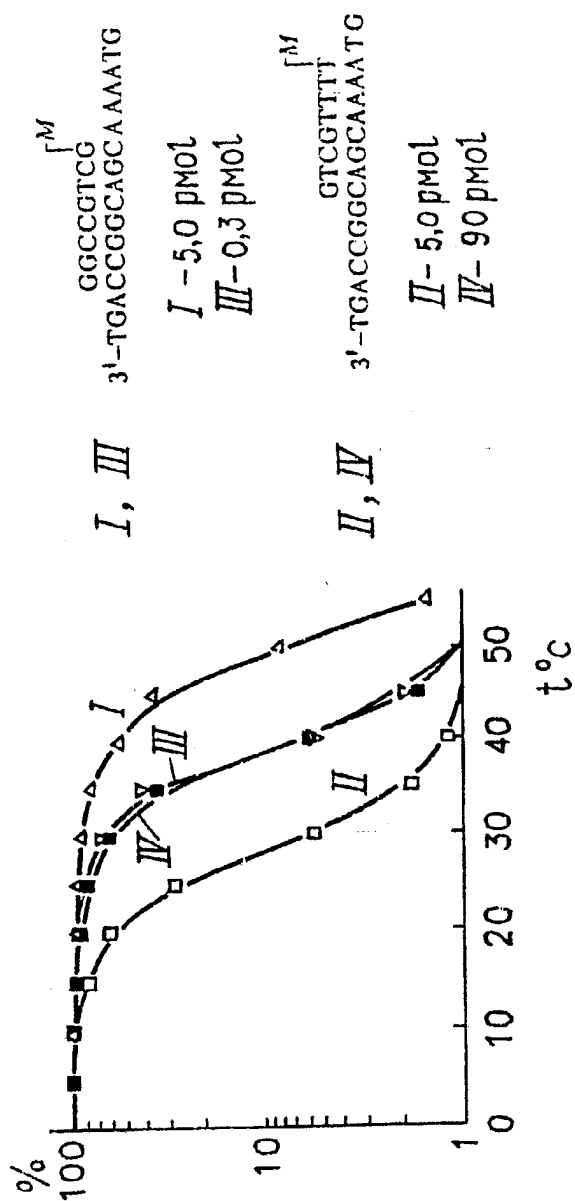


FIG. 6

6/7

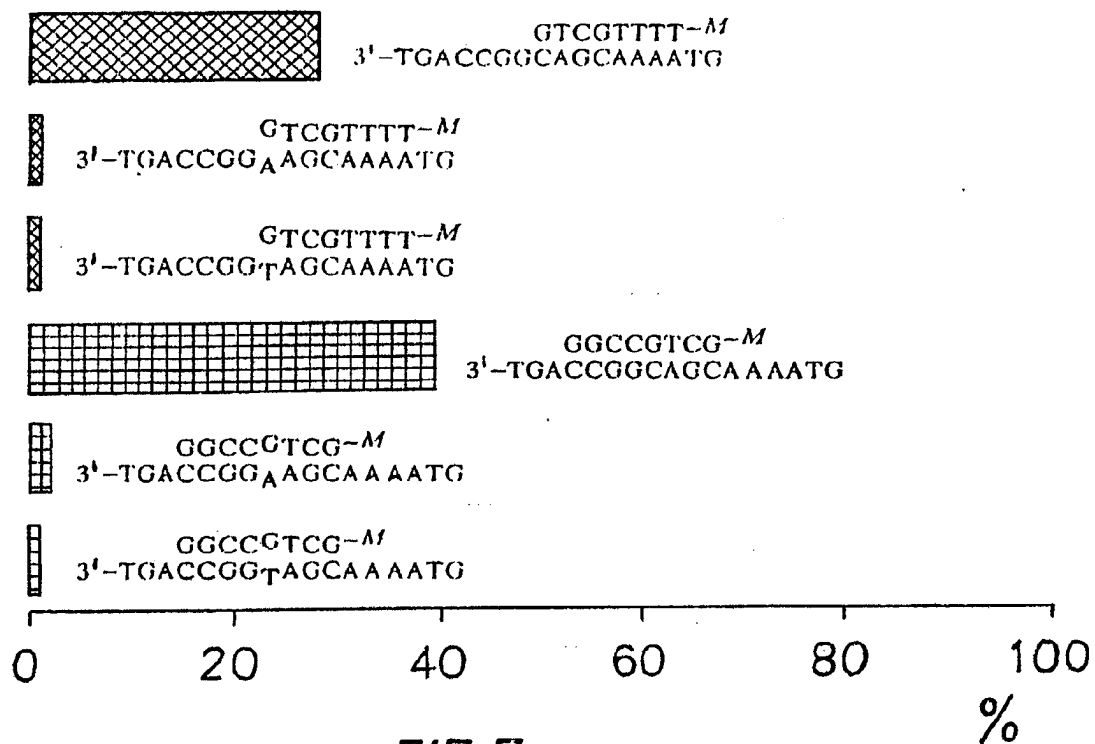


FIG. 7

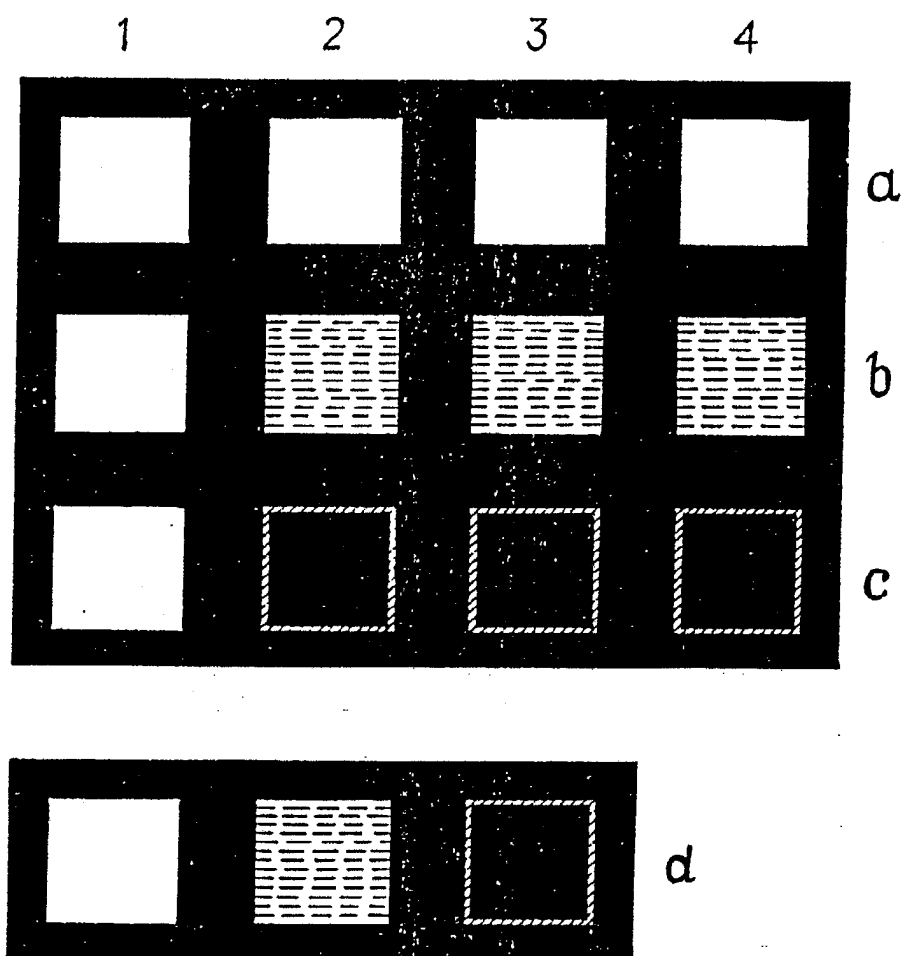
$\frac{7}{7}$ 

FIG. 8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

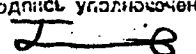
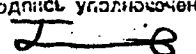
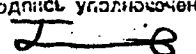
International Application No PCT/RU 92/00052

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) *		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int. Cl. ⁵	C12Q 1/68	
II. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Searched ⁷		
Classification System	Classification Symbols	
Int. Cl. ⁵	C12Q 1/68, C12N 15/00	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the extent that such Documents are included in the Fields Searched *		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT *		
Category *	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³
A	EP, A2, 0266787 (MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V.), 11 May 1988 (11.05.88), the claims	1-9
A	EP, A2, 0322311 (APPLIED BIOSYSTEMS, INC.), 28 June 1989 (28.06.89), the claims	1-5
A	EP, A2, 0132621 (FUJI PHOTO FILM CO., LTD) 13 February 1985 (13.02.85) the claims	1,2
A	EP, A2, 0159719 (ENZO BIOCHEM, INC.), 30 October 1985 (30.10.85), the claims	1,2
<p>* Special categories of cited documents: ¹⁰</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report	
4 June 1992 (04.06.92)	18 June 1992 (18.06.92)	
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer	
ISA/ RU		

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 1985)

ОЧЕТ О МЕЖДУНАРОДНОМ ПОИСКЕ

Международная заявка № PCT/RU 92/00052

<p>I. КЛАССИФИКАЦИЯ ОБЪЕКТА ИЗОБРЕТЕНИЯ (если применяются несколько классификационных индексов, укажите все)⁵</p> <p>В соответствии с Международной классификацией изобретений (МКИ) или как в соответствии с национальной классификацией, так и с МКИ 5 - C12Q 1/68</p>																	
<p>II. ОБЛАСТИ ПОИСКА</p> <p>Минимум документации, охваченной поиском⁷</p> <table border="1"> <tr> <th>Система классификации</th> <th>Классификационные рубрики</th> </tr> <tr> <td>МКИ⁵</td> <td>C12Q 1/68. C12N 15/00</td> </tr> </table> <p>Документация, охваченная поиском и не входившая в минимум документации, в той мере, насколько она входит в область поиска⁸</p>			Система классификации	Классификационные рубрики	МКИ ⁵	C12Q 1/68. C12N 15/00											
Система классификации	Классификационные рубрики																
МКИ ⁵	C12Q 1/68. C12N 15/00																
<p>III. ДОКУМЕНТЫ, ОТНОСЯЩИЕСЯ К ПРЕДМЕТУ ПОИСКА⁹</p> <table border="1"> <tr> <th>Категория*</th> <th>Ссылка на документ¹⁰, с указанием, где необходимо, частей, относящихся к предмету поиска¹²</th> <th>Относится к пункту формулы №¹³</th> </tr> <tr> <td>A</td> <td>EP, A2, 0266787 (MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V.), II мая 1988 (II.05.88), формула</td> <td>1-9</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>EP, A2, 0322311 (APPLIED BIOSYSTEMS, INC.), 28 июня 1989 (28.06.89), формула</td> <td>1-5</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>EP, A2, 0132621 (FUJIFILM PHOTO FILM CO., LTD), 13 февраля 1985 (13.02.85), формула</td> <td>1, 2</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>EP, A2, 0159719 (ENZO BIOSCHEM, INC.), 30 октября 1985 (30.10.85), формула</td> <td>1, 2</td> </tr> </table> <p>* Особые категории ссылок документов¹⁰:</p> <p>A* документ, определяющий общий уровень техники, который не имеет наиболее близкого отношения к предмету поиска.</p> <p>E* более ранний патентный документ, но опубликованный на дату международной подачи или после нее.</p> <p>L* документ, подвергающийся сомнению притязанию на приоритет, или который приводится с целью установления даты публикации другого ссылочного документа, а также в других целях (как указано).</p> <p>O* документ, относящийся к устному раскрытию, применению, выставке и т. д.</p> <p>P* документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты истечения срока приоритета.</p> <p>T* более поздний документ, опубликованный после даты международной подачи или даты приоритета и не порочающий заявку, но приведенный для понимания принципа или теории, на которых основывается изобретение.</p> <p>X* документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска: заявленное изобретение не обладает новизной и изобретательским уровнем.</p> <p>Y* документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; документ в сочетании с одним или несколькими подобными документами порочит изобретательский уровень заявленного изобретения, такое сочетание должно быть очевидно для лица, обладающего познаниями в данной области техники.</p> <p>Z* документ, являющийся членом одного и того же патентного семейства.</p>			Категория*	Ссылка на документ ¹⁰ , с указанием, где необходимо, частей, относящихся к предмету поиска ¹²	Относится к пункту формулы № ¹³	A	EP, A2, 0266787 (MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V.), II мая 1988 (II.05.88), формула	1-9	A	EP, A2, 0322311 (APPLIED BIOSYSTEMS, INC.), 28 июня 1989 (28.06.89), формула	1-5	A	EP, A2, 0132621 (FUJIFILM PHOTO FILM CO., LTD), 13 февраля 1985 (13.02.85), формула	1, 2	A	EP, A2, 0159719 (ENZO BIOSCHEM, INC.), 30 октября 1985 (30.10.85), формула	1, 2
Категория*	Ссылка на документ ¹⁰ , с указанием, где необходимо, частей, относящихся к предмету поиска ¹²	Относится к пункту формулы № ¹³															
A	EP, A2, 0266787 (MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V.), II мая 1988 (II.05.88), формула	1-9															
A	EP, A2, 0322311 (APPLIED BIOSYSTEMS, INC.), 28 июня 1989 (28.06.89), формула	1-5															
A	EP, A2, 0132621 (FUJIFILM PHOTO FILM CO., LTD), 13 февраля 1985 (13.02.85), формула	1, 2															
A	EP, A2, 0159719 (ENZO BIOSCHEM, INC.), 30 октября 1985 (30.10.85), формула	1, 2															
<p>IV. УДОСТОВЕРЕНИЕ ОТЧЕТА</p> <table border="1"> <tr> <td>Дата действительного завершения международного поиска</td> <td>Дата отправки настоящего отчета о международном поиске</td> </tr> <tr> <td>4 июня 1992 (04.06.92)</td> <td>18 июня 1992 (18.06.92)</td> </tr> <tr> <td>Международный поисковый орган</td> <td>Подпись уполномоченного лица</td> </tr> <tr> <td>ISA/RU</td> <td> Н.Шепелев</td> </tr> </table>			Дата действительного завершения международного поиска	Дата отправки настоящего отчета о международном поиске	4 июня 1992 (04.06.92)	18 июня 1992 (18.06.92)	Международный поисковый орган	Подпись уполномоченного лица	ISA/RU	 Н.Шепелев							
Дата действительного завершения международного поиска	Дата отправки настоящего отчета о международном поиске																
4 июня 1992 (04.06.92)	18 июня 1992 (18.06.92)																
Международный поисковый орган	Подпись уполномоченного лица																
ISA/RU	 Н.Шепелев																

Форма PCT/ISA/210 (второй лист) (январь 1985г.) См. примечания на сопроводительном листе